

---

## 総 説

---

# Hypoxia-inducible factor-1: その発現制御および 口腔扁平上皮癌における関わり

山本 哲也

キーワード: 低酸素, *Hypoxia-inducible factor-1*, 口腔扁平上皮癌

## Hypoxia-Inducible Factor-1; its Regulation and Role in Oral Cancer.

Tetsuya YAMAMOTO

**Abstract:** Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a heterodimeric transcription factor that controls the hypoxic response of mammalian cells. HIF-1 plays crucial roles by regulating the transcription of the target genes, which are involved in energy metabolism, angiogenesis, cell proliferation/apoptosis, cell invasion/metastasis, drug resistance. The regulation of HIF-1 involves a variety of mechanism including transcription, translation, post-translational modification, protein-protein interaction and degradation. In tumor cells, HIF-1 is present at high due to hypoxic conditions, the activation of oncogenes or the inactivation of tumor suppressor genes and HIF-1 levels are associated with aggressive progression, diminished therapeutic response and poor prognosis. We have shown that HIF-1 prevents apoptotic cell death of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and that the enhanced expression of HIF-1 in OSCC cells is associated with resistance against chemotherapeutic drugs and  $\gamma$ -rays. Therefore, the inhibition of HIF-1 activity is a strategy for treatment of cancer. HIF-1-targeting anticancer would improve the prognosis of many cancers including oral cancer.

### はじめに

下等動物から哺乳動物に至るすべての生物は、変化する周囲の環境を認識し、それに適応して生存している。この環境変化に対する応答は細胞および個体レベルで営まれており、今日までにその応答機構の多くが分子レベルで詳細に明らかにされてきた。なかでも、生物が生きて行く上で最も重要な酸素の欠乏、すなわち、低酸素環境に対する適応のメカニズムは、近年、分子レベルで急速に解明されてきた。低酸素は生物の周囲環境における酸素分圧の低下だけではなく生体内においても認められ、虚血性心疾患、肺高血圧、関節リウマチ、神経変性疾患、悪性腫瘍などの多くの病態と密接に関連していることが示されている<sup>1-5)</sup>。したがって、生物の低酸素ス

トレスに対する応答機序を明らかにすることはこれらの病態を理解する上で極めて重要で、さらには、この応答機序の解明は低酸素を標的とした新しい治療法の開発に繋がり非常に意義のあることと思われる。

低酸素状態に対する適応機序の解析は主として癌においてなされてきた。固形癌はその異常な増殖のために血液・酸素供給が不十分となり、腫瘍内には低酸素領域が生じるが、癌細胞はこの低酸素環境に適応して生き延びるだけではなく、低酸素ストレスによりその悪性度が高まり、抗癌剤や放射線に対し抵抗性となることが知られている。実際、臨床においても化学・放射線治療を行った場合、血液供給が辺縁部に比べ低いと想定される癌の中心部は、辺縁部に比べ、生残癌細胞が多数認め

られる<sup>6)</sup>。このように、癌細胞は血液・酸素供給の低下に対して、種々の機構によって応答し、その増殖能を維持するが、その中で、転写因子である Hypoxia-inducible factor (HIF-1) が低酸素誘導性遺伝子応答のマスター遺伝子であることが明らかとなった<sup>7)</sup>。HIF-1 は、癌細胞において様々な標的遺伝子の発現誘導を介して生存シグナルを活性化することが示されているが、その作用は癌細胞の生存・増殖のみならず、浸潤・転移、薬剤耐性など多岐に亘ることが知られるようになってきた。しかしながら、癌細胞における HIF-1 の発現制御機構は複雑で、転写、翻訳および翻訳後のレベルで制御されるとともに細胞内における局在もその活性化には重要であり、癌細胞における HIF-1 の役割を明らかにするためにはまだまだ解明すべき点が多く残されている<sup>8-10)</sup>。

本拙論においてはこのような背景の下に、HIF-1 の基本的構造ならびにその主要な発現制御機構について解説するとともに、口腔扁平上皮癌における HIF-1 の関わりについて最近の知見および我々の研究結果を交えて概説することとした。

## 1. HIF-1 の分子構造

HIF-1 は、HIF-1 $\alpha$  および HIF-1 $\beta$ /Aryl hydrocarbon receptor-nuclear translocator (ARNT) からなるヘテロ 2 量体

で、これらはともに Basic helix-loop-helix period (Per)/Arnt/single-minded (Sim) (bHLH-PAS) 型転写因子ファミリーに属し、それぞれ826個(分子量120 kDa)および789個(分子量91~94 kDa)のアミノ酸からなっている(図1)<sup>11,12)</sup>。HIF-1 $\alpha$  および HIF-1 $\beta$  はいずれも、Nuclear localization signal (NLS), bHLH モチーフ, Per/Arnt/Sim (PAS) ドメインおよび Transactivation ドメイン (TAD) を有しており、これらの中で、bHLH モチーフは DNA への結合および 2 量体形成に、PAS ドメインは 2 量体形成に、TAD は Cyclic AMP response element binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/p300, Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1), Transcription intermediary factor-2 (TIF-2) などの共役因子との結合ならびに転写制御に重要な役割を果たしている<sup>13,14)</sup>。HIF-1 $\alpha$  には HIF-1 $\beta$  と異なり、特徴的な 2 つの TAD (N-TAD および C-TAD) が存在し、さらに、N-TAD とオーバーラップした形で Oxygen-dependent degradation (ODD) ドメインが認められる<sup>15,16)</sup>。

HIF-1 $\alpha$  にはアイソフォームとして HIF-2 $\alpha$  および HIF-3 $\alpha$ 1~6 が同定されているが、これらのアイソフォームの組織分布や機能は HIF-1 $\alpha$  と異なっている<sup>17,18)</sup>。HIF-2 $\alpha$  は、HIF-1 $\alpha$  と同様に低酸素条件下において HIF-1 $\beta$  と結合し、標的遺伝子の転写を促進

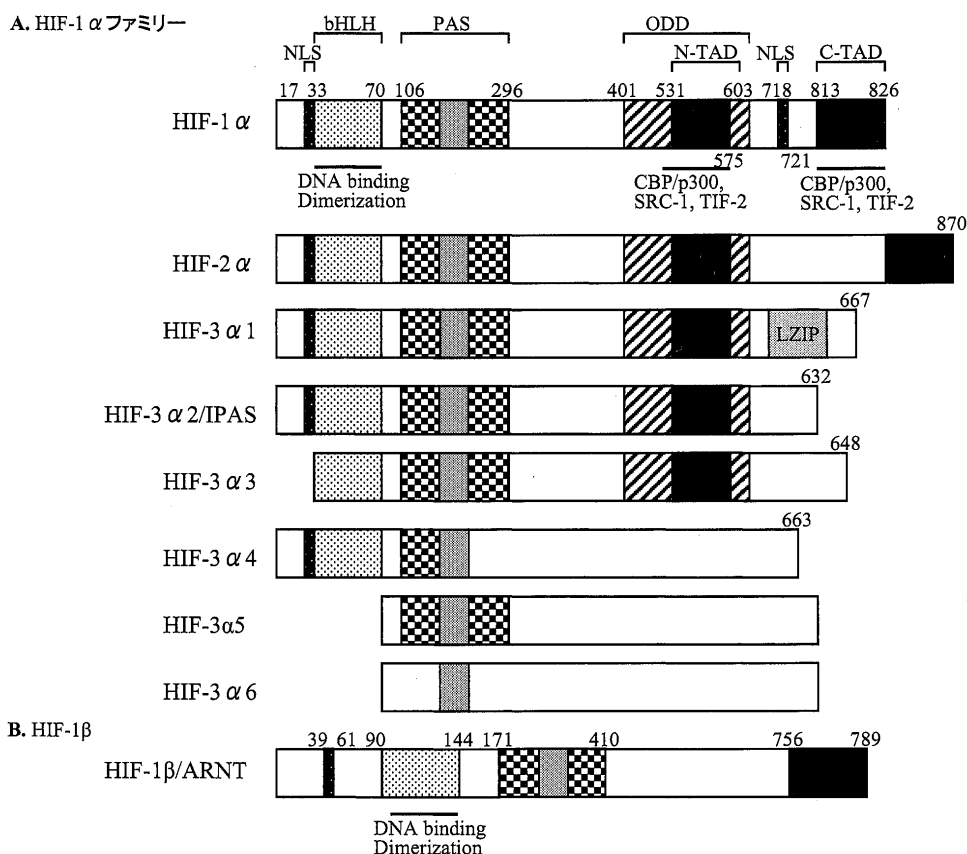


図1 HIF ファミリー蛋白質の構造

する<sup>19,20)</sup>。これに対し、HIF-3 $\alpha$ はHIF-1 $\alpha$ およびHIF-2 $\alpha$ と異なりbHLHとPASドメインは有するもののC-TADは有しておらず、HIF-1 $\beta$ /ARNTと結合はするもののHIF-1依存的遺伝子発現は誘導しない<sup>21)</sup>。つまり、HIF-3 $\alpha$ はDominant negativeに作用するアイソフォームで、HIF-1依存的遺伝子発現を抑制するInhibitory PAS domain protein (IPAS)もHIF-3 $\alpha$ のSplicing variantのひとつである<sup>22)</sup>。

## 2. HIF-1の発現ならびに活性制御機構

ヘテロ2量体であるHIF-1の酸素依存的発現制御は主としてHIF-1 $\alpha$ によっており、HIF-1 $\beta$ の発現は酸素濃度非依存的に、核内においてHIF-1 $\alpha$ と2量体を形成することによりHIF-1の転写活性に影響を及ぼしている(図2)<sup>23,24)</sup>。このHIF-1 $\alpha$ の発現ならびに活性の制御機構は非常に複雑で、酸素濃度のみならずEpidermal growth factor (EGF)やInsulin growth factor-1/2 (IGF-1/2)などの増殖因子、サイトカインによっても影響され、HIF-1 $\alpha$ 自身の転写レベル、翻訳レベルおよび翻訳後レベルで調節されている<sup>8-10)</sup>。HIF-1 $\alpha$ は主に転写因子であるSp1を介して構成的に発現されているが、AP-1、AP-2、NF-1およびNF- $\kappa$ Bなどの転写因子もまたその転写に関与している<sup>9)</sup>。しかしながら、正常酸素分圧下において

HIF-1 $\alpha$ は非常に不安定で(半減期は5分以内)<sup>25)</sup>、このターンオーバーはプロリンおよびアスパラギン残基の水酸化、さらには、リジン残基のアセチル化などの翻訳後修飾によって制御されている(図3)<sup>8)</sup>。

### 2-1. プロリン残基の水酸化

HIF-1 $\alpha$ のODD内に存在するプロリン残基(Pro402およびPro564)は正常酸素分圧下ではProlyl hydroxylase (PHD)によって水酸化修飾を受け、その結果、HIF-1 $\alpha$ はvon Hippel-Lindau (VHL)病の原因遺伝子であるpVHL蛋白質と結合することによりユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解される<sup>26,27)</sup>。PHDは2-oxoglutarate依存性oxygenaseに属し、現在、3種類(PHD1~3)あることが知られている<sup>28,29)</sup>。PHDが作用するためには酸素、Fe<sup>2+</sup>、ならびに、2-oxoglutarateが必要であるために、低酸素状態下においてはPHDの酵素活性は抑制され、その結果、HIF-1 $\alpha$ とpVHLとの結合が生じず、HIF-1 $\alpha$ は分解されずに核に移行し、HIF-1 $\beta$ と結合して転写活性を示すようになる。

### 2-2. アスパラギン残基の水酸化

正常酸素分圧下においては、HIF-1 $\alpha$ のC-TADに存在するアスパラギン残基(Asn803)はFactor inhibiting HIF-1 (FIH)によって水酸化修飾を受けるため、転写共

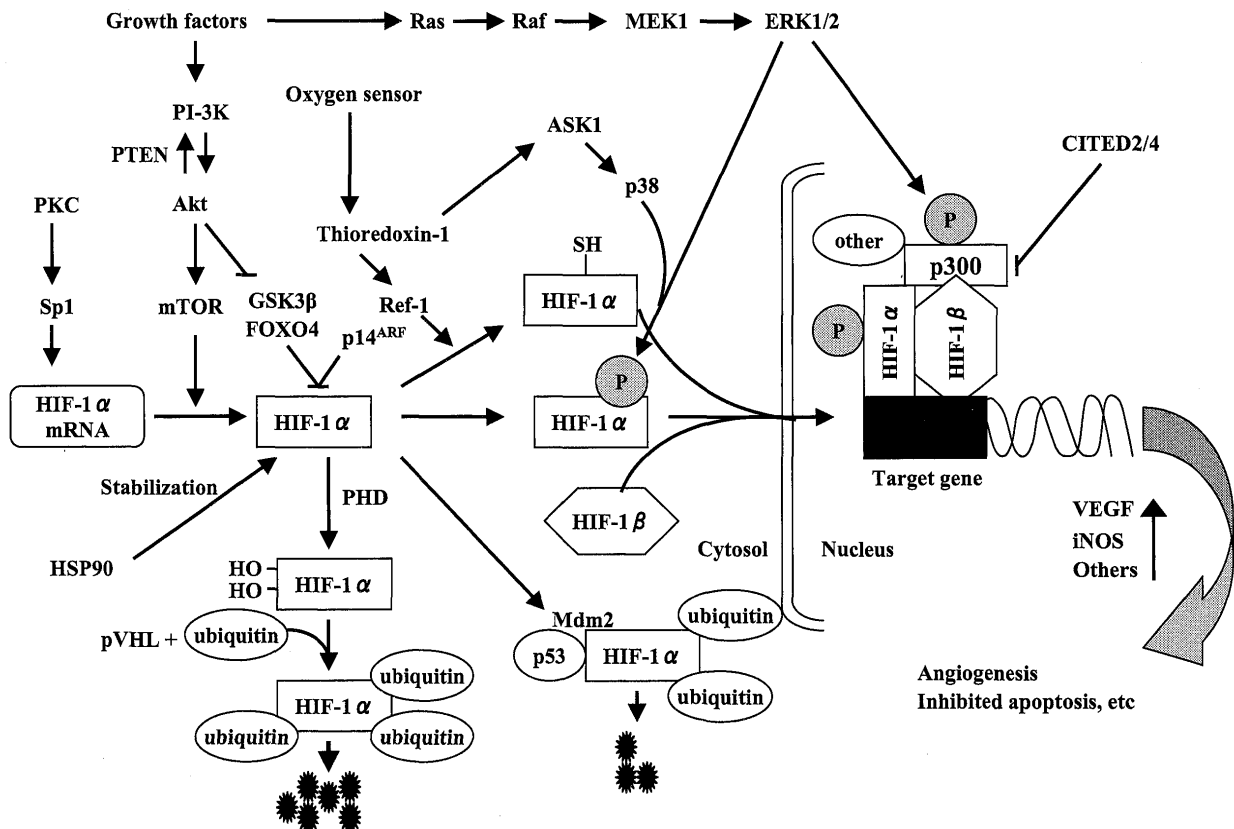


図2 HIF-1 $\alpha$ の主要な発現制御機構(文献80)を改変

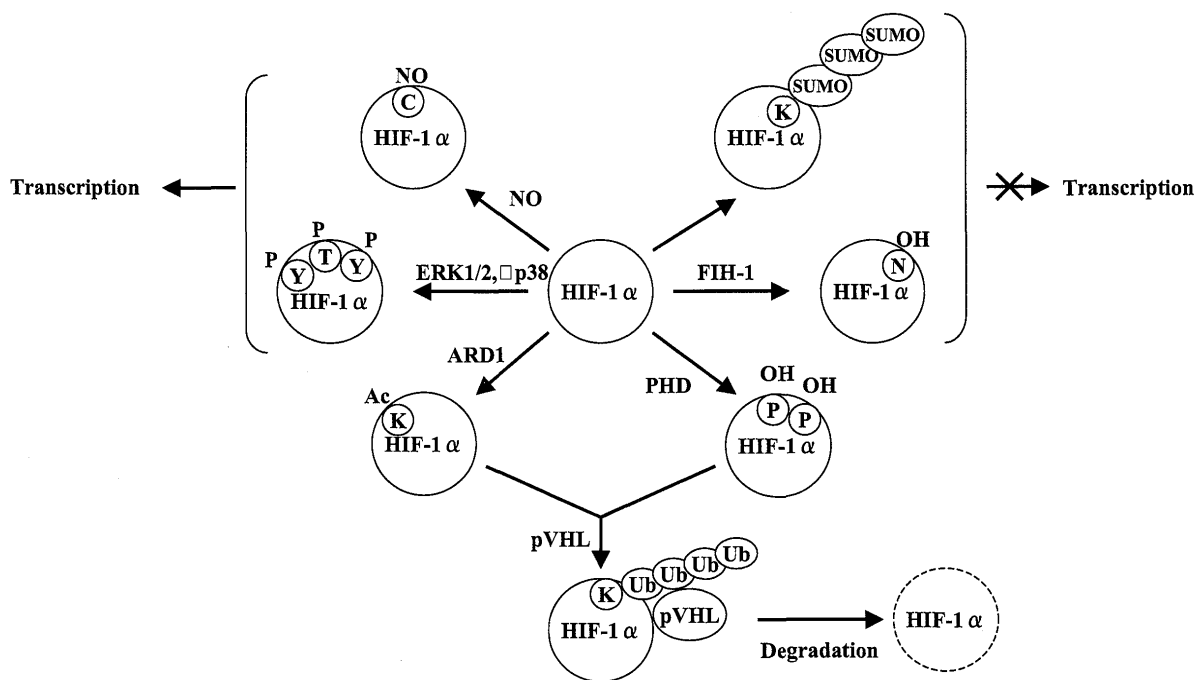


図3 HIF-1 $\alpha$ の翻訳後修飾(文献8)を改変)

役因子である CBP/p300 との相互作用が抑制され、その結果、HIF-1 の転写活性が抑制されることとなる<sup>30)</sup>。FIH もまた酸素および Fe<sup>2+</sup> に依存的で、低酸素状態下においてはこの酵素活性は抑制され、その結果、CBP/p300 が HIF-1 $\alpha$  に結合してその転写活性が亢進する<sup>31, 32)</sup>。

### 2-3. リジン残基のアセチル化

HIF-1 $\alpha$  の ODD 内のリジン残基 (Lys532) が Arrest-defective-1 (ARD1) によってアセチル化されると、HIF-1 $\alpha$  と pVHL との結合が増強され、HIF-1 $\alpha$  のプロテアソーム依存的分解が促進される<sup>33)</sup>。ARD1 は PHD と異なり酸素依存的ではないが、低酸素状態下では ARD1 の mRNA および蛋白質の発現レベルが低下するため HIF-1 $\alpha$  は安定化する。

### 2-4. リン酸化

MAP キナーゼの 1 つである ERK1/2 は、HIF-1 $\alpha$  の C-TAD を直接リン酸化することが報告されており、このリン酸化は HIF-1 $\alpha$  の安定性や DNA への結合能には影響を与えないものの、その転写活性を上昇させる<sup>34)</sup>。さらに、ERK1/2 は CBP/p300 をリン酸化することにより HIF-1 の転写活性を増強させる<sup>35)</sup>。加えて、p38MAP キナーゼも HIF-1 $\alpha$  をリン酸化することにより pVHL との結合さらにはプロテアソーム依存的分解を抑制し、その発現を高めることが報告されている<sup>36, 37)</sup>。

### 2-5. S-ニトロ化

HIF-1 $\alpha$  に対する一酸化窒素 (NO) の作用に関して

は議論のあるところであるが、一酸化窒素 (NO) は HIF-1 $\alpha$  のシステイン残基 (Cys800) を S-ニトロ化 (S-nitrosation) し、HIF-1 $\alpha$  と共役因子である CBP/p300 との結合を促進し、転写活性を増強する<sup>38)</sup>。

### 2-6. SUMO 化

Small ubiquitin-like modifier (SUMO) は分子量が約 12kDa の蛋白質で、転写因子をはじめとした蛋白質に結合し、その蛋白質の核内移行や安定化、標的遺伝子の転写活性制御に関与している<sup>39, 40)</sup>。HIF-1 $\alpha$  の ODD 内のリジン残基 (Lys391 および Lys477) が SUMO 化 (SUMOylation) されると HIF-1 $\alpha$  の安定性および転写活性が抑制されること、さらには、Sentrin/SUMO-specific protease3 (SEN3) は HIF-1 $\alpha$  の転写活性を増強することが知られている<sup>41, 42)</sup>。

### 2-7. その他

HIF-1 $\alpha$  の発現および転写活性は、上述のような翻訳後レベルでの修飾以外でも様々な修飾を受け、それらは酸素分圧の影響をあまり受けない。例えば、ある種の増殖因子やサイトカインは、正常酸素分圧下においても PI3-K/Akt およびその下流に位置する Mammalian target of rapamycin (mTOR) を介して HIF-1 $\alpha$  の安定性や転写活性を増強する<sup>43-46)</sup>。さらに、Heat shock protein 90 (HSP90) 阻害剤である Geldanamycin は pVHL 非存在下に HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化ならびにプロテアソーム依存的分解を促進することより、HSP90 は HIF-1 $\alpha$  の安定化に関与していると考えられている<sup>47, 48)</sup>。

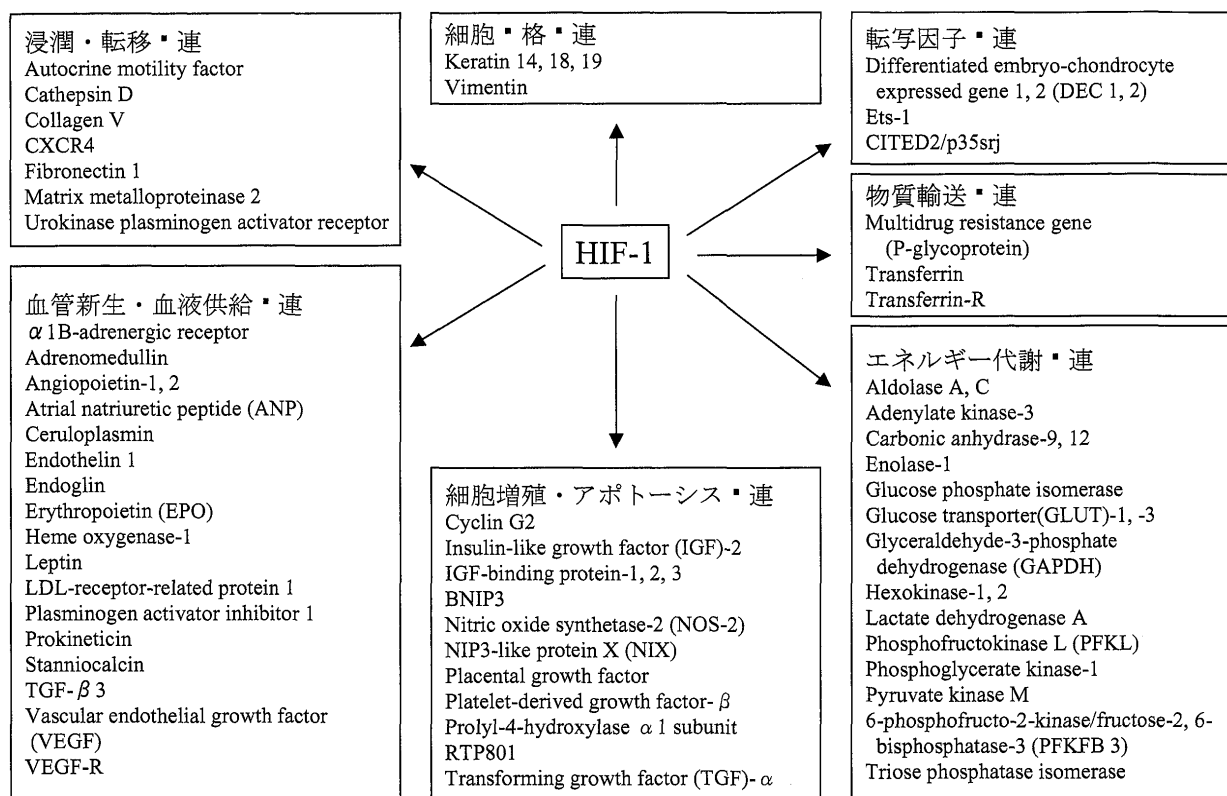


図4 HIF-1αの代表的な標的遺伝子群

活性酸素もまた正常酸素分圧および低酸素分圧下において HIF-1α の発現および転写活性の制御に関与している。過酸化水素処理あるいは NADPH oxidase I の強発現などによって HIF-1α の安定性が増強すること<sup>49, 50)</sup>、低酸素処理によってミトコンドリアでの活性酸素産生が誘導されるとともに Rotenone や Myxothiazol などのミトコンドリア呼吸鎖阻害剤は低酸素処理による HIF-1α 発現を抑制することより<sup>51)</sup>、活性酸素は HIF-1α の発現を正に制御すると考えられる。さらに、HIF-1α はレドックス制御を受けており<sup>52)</sup>、Thioredoxin-1 (Trx-1) は Redox factor-1 (Ref-1) を介して HIF-1α の C-TAD と共役因子である CBP/p300 との結合を促進し、HIF-1α の転写活性を増強する<sup>25, 53)</sup>。Ref-1 による HIF-1α の活性化には C-TAD のシステイン残基の還元が重要であると考えられているが、その詳細な機序については十分には明らかにされていない。

一方、HIF-1α の転写活性を抑制する機構もいくつか存在する。CBP/p300 interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 2/CITED4 は CBP/p300 の Cysteine-histidine (CH1) domain に結合することにより HIF-1α と CBP/p300 との結合を抑制し、HIF-1α の転写活性を抑制する<sup>54, 55)</sup>。さらに、Phosphatase and tensin homologue on chromosome 10 (PTEN) は PI-3K/Akt シグナルを抑制することによりそれを介する HIF-1α の安定性や転写活性の増強を抑制し、Akt の下流位置する Glycogen synthase

kinase 3β (GSK3β) や Forkhead box O (FOXO) 転写因子ファミリーのひとつである FOXO4/ Forkhead transcription factor (AFX) は HIF-1α 発現および活性を負に制御する<sup>56, 57)</sup>。加えて、癌抑制遺伝子産物 p53 は HIF-1α に直接結合してその転写活性を抑制するとともに Mdm2 に依存した HIF-1α の分解を促進し<sup>58-60)</sup>、同じく癌抑制遺伝子産物 p14<sup>ARF</sup> も HIF-1α に直接結合してその転写活性を抑制することが報告されている<sup>61)</sup>。

### 3. HIF-1の標的遺伝子および生物学的作用

転写因子である HIF-1 は、プロモーター領域に存在する 5'-RCGTG-3' 配列の Hypoxia-responsive element (HRE) に結合することにより転写を誘導する<sup>62)</sup>。HRE を有する HIF-1 の標的遺伝子としては、Erythropoietin や Vascular endothelial growth factor (VEGF) をはじめとしてこれまで60以上の遺伝子が明らかにされている(図4)<sup>7, 63, 64)</sup>。これらの遺伝子産物の機能は、エネルギー代謝、細胞増殖・アポトーシス、浸潤・転移、血液供給、血管新生、物質輸送、転写など多岐に亘っており、HIF-1 は細胞の様々な機能の調節に重要な役割を果たしている。

### 4. 癌と HIF-1

乳癌、大腸癌、前立腺癌をはじめとした多くの癌において HIF-1α の発現が亢進しており、HIF-1α を高発現し

ている癌の悪性度は強く、抗癌剤や放射線に抵抗性で、予後も悪いことが報告されている<sup>65-67)</sup>。癌細胞が HIF-1 $\alpha$  を高発現する機序としては低酸素が挙げられる。固形腫瘍においては、癌細胞の異常増殖により酸素の需要と供給との間にアンバランスが生じるとともに、腫瘍の増殖に伴い正常血管が崩壊し、さらには、宿主の貧血により酸素運搬能が低下することにより低酸素領域が生じる。しかしながら、癌細胞における HIF-1 $\alpha$  の発現誘導は低酸素とは関係なしに生じることもある。例えば、多くの癌では癌抑制遺伝子である p53 に変異を来たしているために p53/Mdm2 を介した HIF-1 $\alpha$  の分解が抑制され、さらには、ある種の腎癌や脳腫瘍では VHL 遺伝子の不活性化により HIF-1 $\alpha$  の分解が抑制され、その結果、HIF-1 $\alpha$  発現が亢進することが知られている<sup>66,68)</sup>。加えて、前立腺癌では PI-3K/Akt シグナルを介する HIF-1 $\alpha$  発現誘導を負に制御する PTEN 遺伝子に高頻度に変異が認められるために HIF-1 $\alpha$  の発現が誘導され<sup>69)</sup>、乳癌では HER2 や v-Src などの癌遺伝子が HIF-1 $\alpha$  を誘導する<sup>70,71)</sup>。このように、癌細胞における HIF-1 $\alpha$  の発現亢進や活性化には低酸素のみならず多くの要因が関わっている。

癌細胞において発現された HIF-1 $\alpha$  はその標的遺伝子産物を介して種々の影響を及ぼすことが考えられるが、図4に示したようにその標的遺伝子産物の機能は多岐に亘っており非常に複雑といえる。大別すると、VEGFなどを介しての血管新生、Transforming growth factor (TGF)などのサイトカインやグルコース代謝関連酵素などを介した増殖促進、BNIP3などによるアポトーシス抑制、Matrix metalloproteinase-2などを介した浸潤・転移能の亢進、P糖蛋白質による薬剤耐性獲得などが挙げられる。

しかしながら、低酸素環境下に置かれた癌細胞がより増殖・浸潤し、さらには、治療に抵抗性となるメカニズムは複雑で、すべてが HIF-1 $\alpha$  に依存している訳ではなく、低酸素によって誘導される他の因子も影響している。低酸素下ではエンドヌクレアーゼ活性の上昇や DNA 修復機構の抑制により遺伝子不安定性が増すことや<sup>72)</sup>、NF- $\kappa$ B や CREB などの転写因子が活性化することより、これらを介して癌細胞の悪性形質が変化することが示唆されている<sup>73)</sup>。

## 5. 口腔癌における HIF-1の関わり

口腔癌を含めた頭頸部癌における HIF-1 についての報告はそれほど多くはなされていない<sup>74-77)</sup>。Aebersold らは、口咽頭癌において HIF-1 $\alpha$  の発現程度はリンパ節転移の有無、放射線治療の効果および局所制御率と関連することを報告し<sup>74)</sup>、Koukourakis らは頭頸部扁平上皮癌において HIF-1 $\alpha$  の発現は局所浸潤性、化学・放射線療法の効果、局所制御率を含めた予後と関連することを明らかにしている<sup>75)</sup>。しかしながら、Beasley らは、頭頸部扁平上皮癌において HIF-1 $\alpha$  を高発現している症例の予

後は高発現していない症例に比べて良好であるとし<sup>76)</sup>、Kyzas らは頭頸部扁平上皮癌における HIF-1 $\alpha$  の発現程度と予後との間には関連は無いと報告している<sup>77)</sup>。

株化口腔扁平上皮癌 (OSC) 細胞を用いて低酸素誘導アポトーシスに及ぼす HIF-1 $\alpha$  の影響を検討したところ、OSC 細胞を低酸素 (1% O<sub>2</sub>) 下で培養すると HIF-1 $\alpha$  の発現が増強するもののその発現程度は弱く、活性酸素産生ならびにアポトーシスが誘導された (図5)<sup>78)</sup>。一方、HIF-1 $\alpha$  を強発現させた OSC 細胞においては、低酸素処理をおこなっても活性酸素レベルはコントロール細胞と比べ低く、アポトーシス誘導もほぼ完全に抑制された。さらに、HIF-1 $\alpha$  を強発現させた OSC 細胞においては癌細胞の生存シグナルに関わる PI-3K、リン酸化 Akt およびリン酸化 ERK1/2 の発現レベルが上昇し、チトクローム c のミトコンドリアから細胞質への放出も抑制されていた (図6)。さらに、Bcl-2 ファミリー蛋白に及ぼす影響について見たところ、HIF-1 $\alpha$  強発現 OSC 細胞では Bcl-2 および Bcl-X<sub>L</sub> 蛋白質の発現は亢進し、逆に、Bax および Bak の発現は抑制されることが明らかとなった。加えて、OSC 細胞における HIF-1 $\alpha$  の発現レベルと抗癌剤および  $\gamma$  線に対する感受性を検討したところ、両者には逆の相関が認められ、HIF-1 $\alpha$  を強く発現している OSC 細胞は HIF-1 $\alpha$  の発現が弱い OSC 細胞に比較して CDDP、5-FU および  $\gamma$  線に対してより抵抗性であることが明らかとなった (図7)。これらの結果は、OSC 細胞における HIF-1 は細胞生存シグナルを増強する一方で、アポトーシスシグナルを抑制することを意味しているが、頭頸部癌、とりわけ、口腔扁平上皮癌における HIF-1 $\alpha$  の関わりについては更なる検討が必要であると思われる。

ところで、興味あることに CDDP、5-FU および  $\gamma$  線は OSC 細胞における HIF-1 $\alpha$  発現を誘導することが明らかになった (図5)。抗癌剤および放射線による HIF-1 $\alpha$  発現誘導の機序については不明であるが、我々は OSC 細胞を抗癌剤や放射線で処理すると活性酸素産生が誘導されることを明らかにしている<sup>79)</sup>。前述のように活性酸素は HIF-1 $\alpha$  を正に制御することより、抗癌剤や放射線は活性酸素産生を介して HIF-1 $\alpha$  発現を誘導するのではないかと考えられる。

## 6. HIF-1 $\alpha$ をターゲットとした分子標的治療

近年、EGF 受容体や HER2 蛋白質をはじめとした種々の分子に対する分子標的治療が開発され、実際、それらの中のいくつかは臨床使用されている。前述のように、多くの癌では HIF-1 $\alpha$  の発現は亢進しており、発現の亢進した癌は増殖能が活発で、化学・放射線療法に対しても抵抗性であることより、癌細胞における HIF-1 $\alpha$  の活性を抑制することは腫瘍の増殖を抑制するだけでなく、化学・放射線治療に対する感受性を増強させることに繋がると考えられる。我々は、OSC 細胞において抗

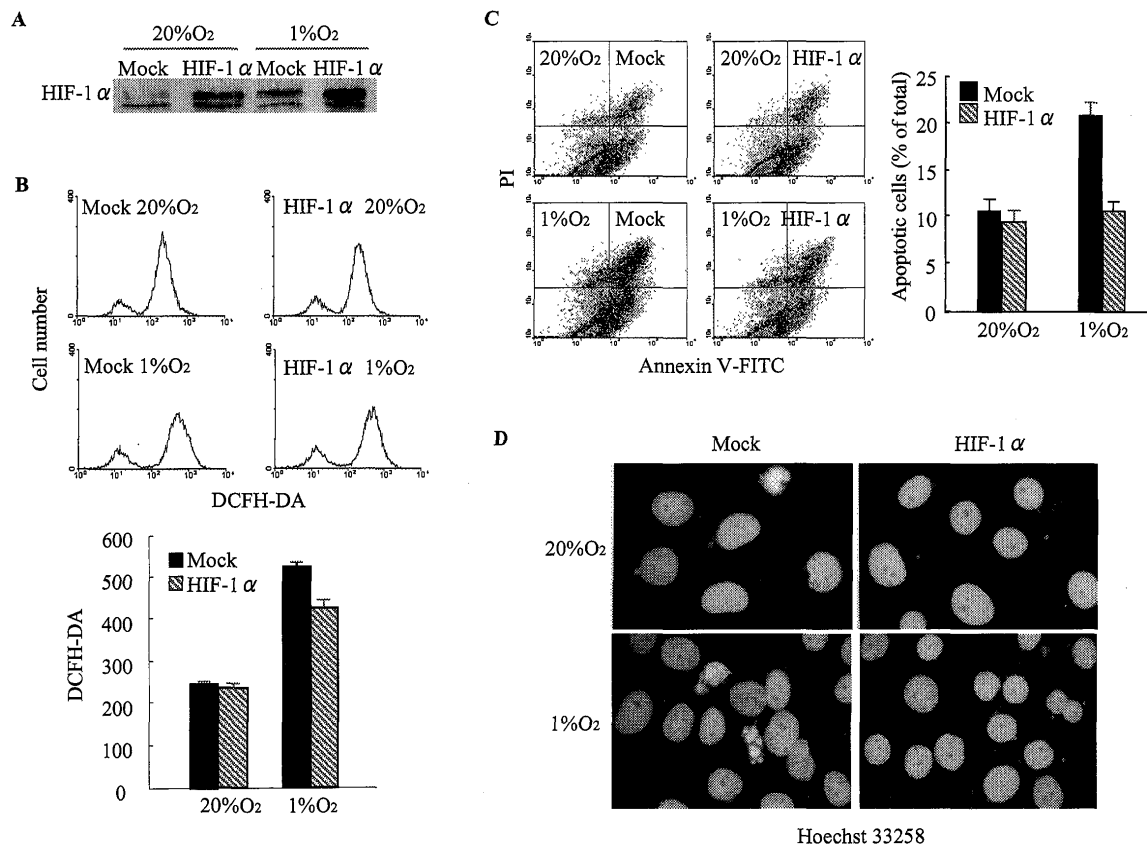


図5 低酸素による OSC 細胞のアポトーシス誘導に及ぼす HIF-1 $\alpha$  の影響  
コントロール (Mock) および HIF-1 $\alpha$  発現ベクター (HIF-1 $\alpha$ ) を導入した OSC-4 細胞を20% O<sub>2</sub> あるいは1% O<sub>2</sub> の条件下で24時間培養したときの HIF-1 $\alpha$  発現 (A), 細胞内活性酸素レベル (B), アポトーシス (C) および DNA 断片化 (D)。

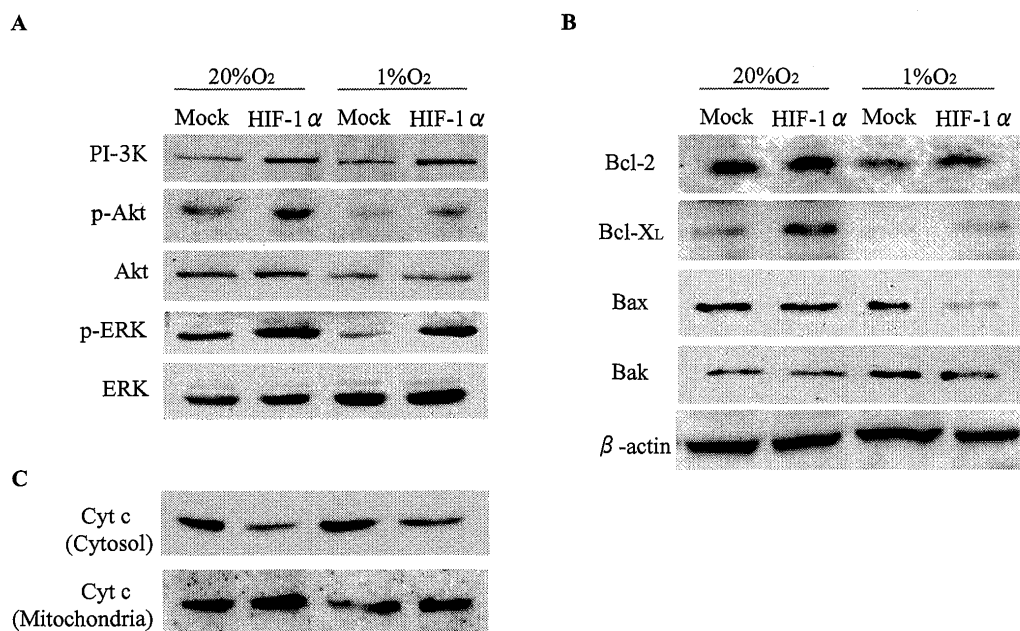
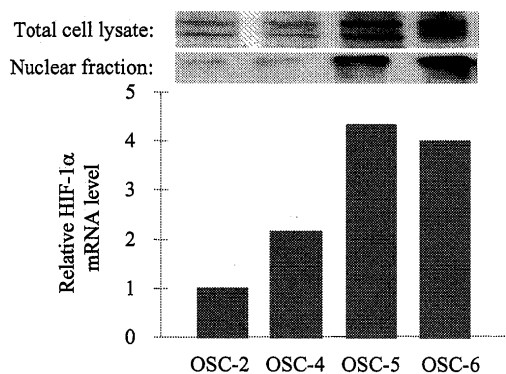
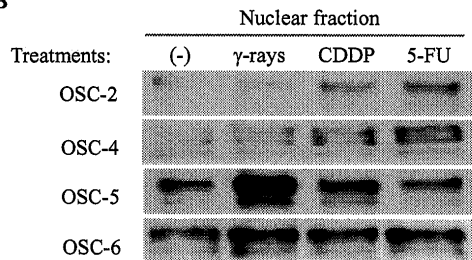


図6 OSC 細胞における生存およびアポトーシスシグナルに及ぼす低酸素および HIF-1 $\alpha$  の影響  
コントロール (Mock) および HIF-1 $\alpha$  発現ベクター (HIF-1 $\alpha$ ) を導入した OSC-4 細胞を20% O<sub>2</sub> あるいは1% O<sub>2</sub> の条件下で24時間培養したときの各蛋白質の発現。

A



B



C

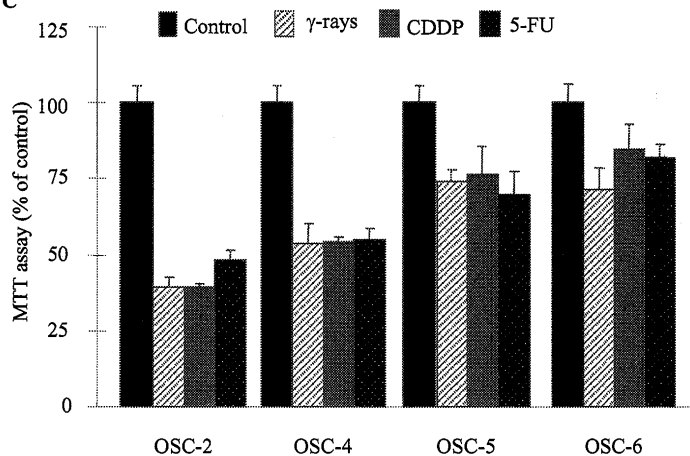
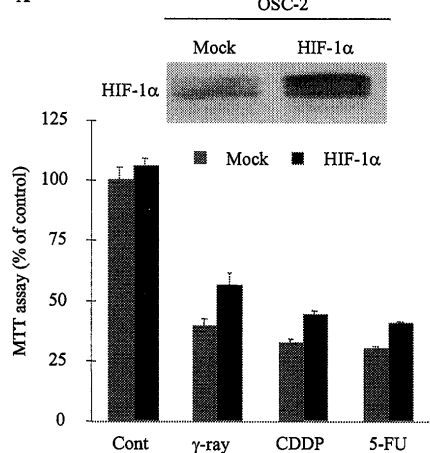


図7 OSC細胞における HIF-1α の発現と抗癌剤およびγ線に対する感受性

A: OSC-2, -4, -5 および -6 細胞における HIF-1α の mRNA (リアルタイム PCR) および蛋白質発現。

B, C: 各 OSC 細胞を γ 線 (30Gy) 照射後24時間培養するか, あるいは, CDDP (100μM) ないしは 5-FU (100μM) で24時間処理したときの HIF-1α 発現 (B) および細胞増殖 (C)。

A



B

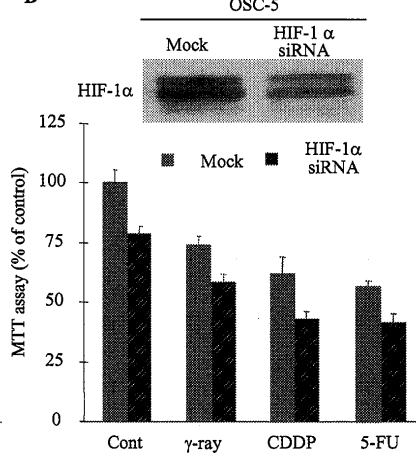


図8 HIF-1α ノックダウンによる OSC 細胞の抗癌剤およびγ線に対する感受性の増強

HIF-1α 発現ベクターを導入した OSC-2 および HIF-1α に対する siRNA を導入した OSC-5細胞の γ 線 (30Gy), CDDP (100μM) および 5-FU (100μM) に対する感受性。

癌剤およびγ線に低感受性の HIF-1α 高発現株に HIF-1α の siRNA を導入すると感受性が増強し, 逆に, 抗癌剤およびγ線に高感受性の HIF-1α 低発現株に HIF-1α 発現ベクターを導入すると感受性が低下することを確かめている (図8)。HIF-1α 高発現 OSC 細胞の抗癌剤およびγ線に対する抵抗性の獲得には, HIF-1α の標的遺伝子である MDR1, Heme oxygenase-1 および Ceruloplasmin が関わっており, MDR1 遺伝子産物である P 糖蛋白質は

抗癌剤の細胞外への排出を促進すること, 抗酸化作用を有する Heme oxygenase-1 および Ceruloplasmin は抗癌剤やγ線による細胞死誘導に重要な活性酸素を消去することを明らかにしている (図9)。従って, HIF-1α に対する siRNA はこれらの分子の発現を抑制することにより, OSC 細胞の抗癌剤やγ線に対する感受性を増強しているものと考えられる。

HIF-1 抑制作用を有する薬剤には多くのものがあ



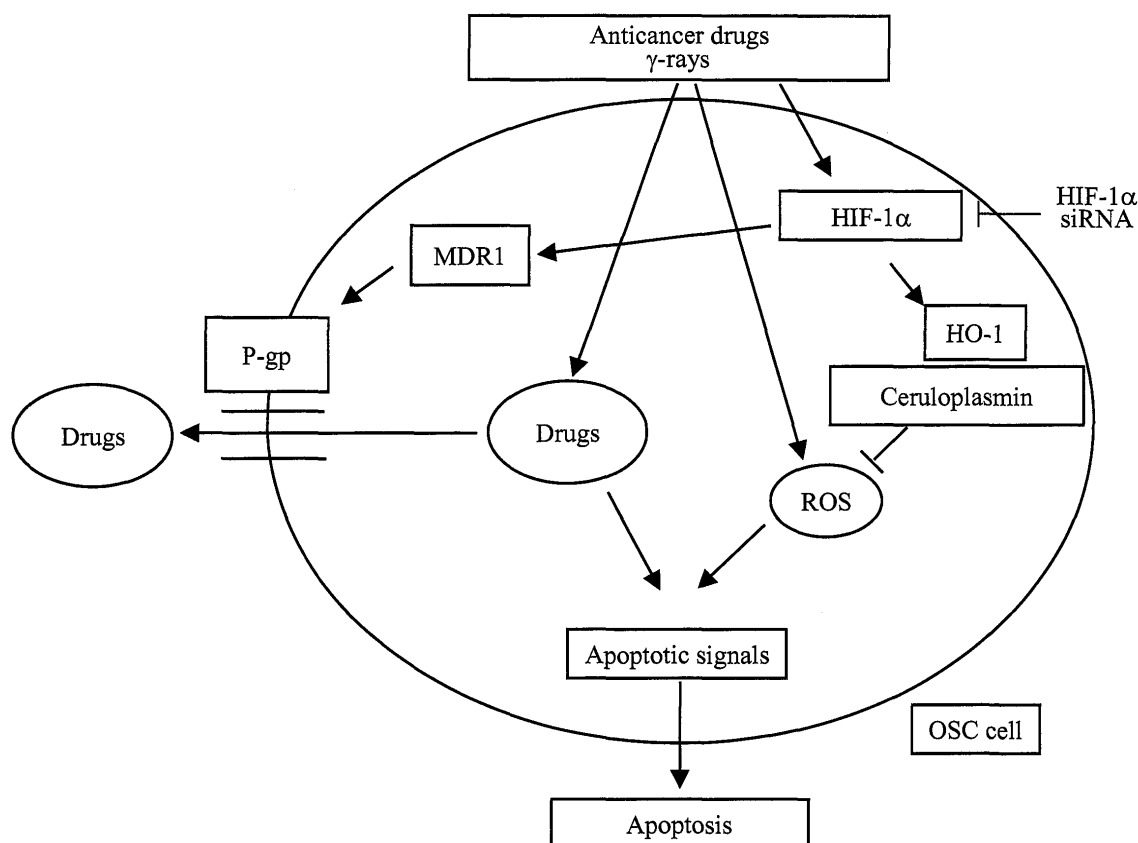


図9 OSC細胞の抗癌剤およびγ線に対する抵抗性獲得におけるHIF-1αの関与

り<sup>64, 80, 81)</sup>、現在臨床使用されている分子標的薬である Trastuzumab, Celebex, Imatinib などにも HIF-1α 抑制作用を有することが確認されている<sup>81)</sup>。それらに加え、HSP90 抑制作用を有する 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17AAG) およびエストロゲンの天然代謝産物である 2-methoxyestradiol (2-ME2) もまた HIF-1α 抑制作用を有し、現在、臨床試験が行われているところである<sup>82, 83, 84)</sup>。今後は、これらの薬剤と抗癌剤あるいは放射線との併用療法の効果が試され、口腔癌の治療成績の向上をもたらすものと期待される。しかしながら、HIF-1α のみをノックダウンしても代替経路とし NF-κB を介した IL-8 産生が誘導され、血管新生は抑制されないということが報告されており<sup>85)</sup>、いくつかの分子標的療法の併用といった方法をさらに検討すべきと考えられる。

### おわりに

以上のように、HIF-1 の発現制御機構は非常に複雑で、また、その標的遺伝子の機能も多岐に亘っており、HIF-1 の役割は個々の細胞によって異なっていると考えられる。しかしながら、癌細胞において発現されている HIF-1 は、単に低酸素によって誘導される転写因子としてではなく、癌化に伴っても誘導される転写因子として大きな役割を果たしており、癌治療という観点からする

と標的とすべき分子の一つであると思われる。今後、現在展開されている HIF-1 を標的とした分子標的療法の開発を進めるとともに、これらと抗癌剤や放射線との組み合わせによる治療法の開発を進めてゆくことにより、癌治療の治療成績の向上を図ることが出来るものと期待される。

### 文 献

- 1) Sabbah HN, Sharov VG and Goldstein S: Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 5, 131-138 (2000)
- 2) Strange C and Highland KB: Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 11, 452-455 (2005)
- 3) Taylor PC and Sivakumar B: Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 17, 293-298 (2005)
- 4) Freeman RS and Barone MC: Targeting hypoxia-inducible factor (HIF) as a therapeutic strategy for CNS disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4, 85-92 (2005)
- 5) Bacon AL and Harris AL: Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. *Ann Med* 36, 530-539 (2004)

- 6) Osaki T, Hirota J, Yoneda K, Yamamoto T and Ueta E: Distribution of surviving tumor cells after chemoradiotherapy in tongue and floor of mouth carcinomas. *Head Neck* 16, 218-226 (1994)
- 7) Zagorska A and Dulak J: HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* 51, 563-585 (2004)
- 8) Brahimi-Horn C, Mazure N and Pouyssegur J: Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* 17, 1-9 (2005)
- 9) Dery MA, Michaud MD and Richard DE: Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 535-540 (2005)
- 10) Bardos JJ and Ashcroft M: Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta* 1755, 107-120 (2005)
- 11) Wang GL and Semenza GL: Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270, 1230-1237 (1995)
- 12) Wang GL, Jiang BH, Rue EA and Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PA S heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5510-5514 (1995)
- 13) Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R and Semenza GL: Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 17771-17778 (1996)
- 14) Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadow JM and Ratcliffe PJ: Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the  $\alpha$  subunit. *J Biol Chem* 272, 11205-11214 (1997)
- 15) Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R and Semenza GL: Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 272, 19253-19260 (1997)
- 16) Huang LE, Gu J, Schau M and Bunn HF: Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7987-7992 (1998)
- 17) Wenger RH: Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* 16, 1151-1162 (2002)
- 18) Semenza GL: Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 551-578 (1999)
- 19) Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ and Maxwell PH: Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Blood* 92, 2260-2268 (1998)
- 20) Tian H, McKnight SL and Russell DW: Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11, 72-82 (1997)
- 21) Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y and Imura N: Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun* 287, 808-813 (2001)
- 22) Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A and Poellinger L: Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414, 550-554 (2001)
- 23) Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, fhitelaw ML, Toftgard R, Tora L, Gassmann M and Poellinger L: Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 16, 5221-5231 (1996)
- 24) Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J and Poellinger L: Activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5667-5672 (1997)
- 25) Huang LE, Arany Z, Livingston DM and Bunn HF: Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its  $\alpha$  subunit. *J Biol Chem* 271, 32253-32259 (1996)
- 26) Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER and Ratcliffe PJ: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 401, 271-275 (1999)
- 27) Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW and Ratcliffe PJ: Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472 (2001)
- 28) Masson N and Ratcliffe PJ: HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O<sub>2</sub> levels. *J Cell Sci* 116, 3041-3049 (2003)
- 29) Lando D, Gorman JJ, Whitelaw ML and Peet DJ:

- Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur J Biochem* 270, 781-790 (2003)
- 30) Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML and Bruck RK: FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16, 1466-1471 (2002)
  - 31) Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, Acker H and Fandrey J: Intracellular localisation of human HIF-1 $\alpha$  hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116, 1319-1326 (2003)
  - 32) Linke S, Stojkoski C, Kewley RJ, Booker GW, Whitelaw ML and Peet DJ: Substrate requirements of the oxygen-sensing asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279, 4391-4397 (2004)
  - 33) Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ and Kim KW: Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111, 709-720 (2002)
  - 34) Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D and Pouyssegur J: p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 274, 32631-32637 (1999)
  - 35) Lee E, Yim S, Lee SK and Park H: Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. *Mol Cells* 14, 9-15 (2002)
  - 36) Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA and Gutkind JS: The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Cancer Res* 60, 4873-4880 (2000)
  - 37) Kwon SJ, Song JJ and Lee YJ: Signal pathway of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  phosphorylation and its interaction with von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during ischemia in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 11, 7607-7613 (2005)
  - 38) Yasinska IM and Sumbayev VV: S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 $\alpha$  protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 549, 105-109 (2003)
  - 39) Melchior F, Schergaut M and Pichler A: SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* 28, 612-618 (2003)
  - 40) Seeler JS and Dejean A: Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 690-699 (2003)
  - 41) Tojo M, Matsuzaki K, Minami T, Honda Y, Yasuda H, Chiba T, Saya H, Fujii-Kuriyama Y and Nakao M: The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J Biol Chem* 277, 46576-46585 (2002)
  - 42) Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ and Kim KW: Sumoylation increases HIF-1 $\alpha$  stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 394-400 (2004)
  - 43) Semenza G: Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64, 993-998 (2002)
  - 44) Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M and Michiels C: Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med* 31, 847-855 (2001)
  - 45) Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ and Abraham RT: Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22, 7004-7014 (2002)
  - 46) Mayerhofer M, Valent P, Sperr WR, Griffin JD and Sillaber C: BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. *Blood* 100, 3767-3775 (2002)
  - 47) Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK and Wenger RH: Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilization. *Cell Physiol Biochem* 14, 351-360 (2004)
  - 48) Isaacs JS, Jung YJ and Neckers L: Aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) promotes oxygen-independent stabilization of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by modulating an Hsp90-dependent regulatory pathway. *J Biol Chem* 279, 16128-16135 (2004)
  - 49) Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM and Schumacker PT: Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem* 275, 25130-25138 (2000)
  - 50) Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schmidt HH, Seeger W and Hanze J: Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36, 1279-1288 (2004)

- 51) Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC and Schumacker PT: Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11715-11720 (1998)
- 52) Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM and Powis G: The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res* 62, 5089-5095 (2002)
- 53) Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L and Fujii-Kuriyama Y: Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 $\alpha$  in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 18, 1905-1914 (1999)
- 54) Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL and Livingston DM: Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 13, 64-75 (1999)
- 55) Braganca J, Eloranta JJ, Bamforth SD, Ibbitt JC, Hurst HC and Bhattacharya S: Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2. *J Biol Chem* 278, 16021-16029 (2003)
- 56) Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M and Michiels C: Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem* 278, 31277-31285 (2003)
- 57) Tang TT and Lasky LA: The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. *J Biol Chem* 278, 30125-30135 (2003)
- 58) An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV and Neckers LM: Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Nature* 392, 405-408 (1998)
- 59) Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T and Neckers L: p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem* 273, 11995-11998 (1998)
- 60) Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL and Bedi A: Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev* 14, 34-44 (2000)
- 61) Fatyol K and Szalay AA: The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and inhibits HIF-1-mediated transcription. *J Biol Chem* 276, 28421-28429 (2001)
- 62) Guillemin K and Krasnow MA: The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 89, 9-12 (1997)
- 63) Semenza GL: Hydroxylation of HIF-1: Oxygensensing at the molecular level. *Physiology* 19, 176-182 (2004)
- 64) Yeo EJ, Chun YS and Park JW: New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* 68, 1061-1069 (2004)
- 65) Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, Gatter KC and Harris AL: Relation of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* 85, 881-890 (2001)
- 66) Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenacker G and Oberhuber G: Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7, 1661-1668 (2001)
- 67) Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ and van der Wall E: Levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 97, 1573-1581 (2003)
- 68) Krieg M, Haas R, Brauch H, Acker T, Flamme I and Plate KH: Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 19, 5435-5443 (2000)
- 69) Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D and Giaccia AJ: Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 14, 391-396 (2000)
- 70) Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC and Semenza GL: HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21, 3995-4004 (2001)
- 71) Jiang BH, Agani F, Passaniti A and Semenza GL: V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 57, 5328-5335 (1997)
- 72) Stoler DL, Anderson GR, Russo CA, Spina AM and Beerman TA: Anoxia-inducible endonuclease activity

- as a potential basis of the genomic instability of cancer cells. *Cancer Res* 52, 4372-4378 (1992)
- 73) Cummins EP and Taylor CT: Hypoxia-responsive transcription factors. *Eur J Physiol* 450, 363-371 (2005)
  - 74) Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH and Semenza GL: Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 61, 2911-2916 (2001)
  - 75) Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, Gatter KC and Harris AL: Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53, 1192-1202 (2002)
  - 76) Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S and Harris AL: Hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in head and neck cancer: Relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 62, 2493-2497 (2002)
  - 77) Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A and Agnantis NJ: Hypoxia-induced tumor angiogenic pathway in head and neck cancer: an in vivo study. *Cancer Lett* 225, 297-304 (2005)
  - 78) Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T and Osaki T: Mechanism of HIF-1 $\alpha$ -dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 96, 394-402 (2005)
  - 79) Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E, Doi S and Osaki T: Enhanced apoptosis of squamous cell carcinoma cells by interleukin-2-activated cytotoxic lymphocytes combined with radiation and anticancer drugs. *Eur J Cancer* 36, 2007-2017 (2000)
  - 80) Powis G and Kirkpatrick L: Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther* 3, 647-354 (2004)
  - 81) Brennan PA, Mackenzie N and Quintero M: Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in oral cancer. *J Oral Pathol Med* 34, 385-389 (2005)
  - 82) Neckers L and Ivy SP: Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* 15, 419-424 (2003)
  - 83) Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, Willard MT, Zhong H, Simons JW and Giannakakou P: 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 3, 363-375 (2003)
  - 84) Ricker JL, Chen Z, Yang XP, Pribluda VS, Swartz GM and Van Waes C: 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 8665-8673 (2004)
  - 85) Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Zukerberg LR, Kohgo Y, Lynch MP, Rueda BR and Chung DC: Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1 $\alpha$ -deficient colon cancer cells. *Nat Med* 11, 992-997 (2005)